

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.

Vol. 24, 1986, pp. 379–386

© 1986 by Walter de Gruyter & Co.
Berlin · New York

Eine neue Methode zur schnellen und einfachen Adsorption von Rheumafaktoren aus Serum

Von G. Kolb und R. Allner

Zentrallaboratorium (Leiter: Prof. Dr. R. Allner †)¹) der Städtischen Kliniken Fulda, Akademisches Lehrkrankenhaus der Philipps-Universität Marburg

(Eingegangen am 6. August 1985/16. Januar 1986)

Meinem verehrten Lehrer und Mentor R. Allner zum Gedenken

Zusammenfassung: Es ist bereits hinreichend bekannt, daß Autoantikörper gegen humanes Gammaglobulin, sogenannte Rheumafaktoren, immunologische Bestimmungsmethoden stören (1, 2). Insbesondere die Enzym-linked-Immunoassays (ELISA) zum Nachweis spezifischer Immunität bei frischen viralen Infektionen (z. B. Röteln, Masern etc.) zeigen falsch positive Ergebnisse, wenn die Proben IgM-Rheumafaktoren enthalten (3, 4).

Die von uns entwickelte Kombination von Festphase- und Flüssigkeitsphase-Technik — eine Suspension von Glutaraldehyd-vernetztem aggregiertem IgG — stellt eine neue Methode zur schnellen Adsorption und Elimination von Rheumafaktoren aus Serumproben dar.

In einem zweiten Schritt können bei saurem pH die Rheumafaktoren wieder desorbiert werden, so daß das Adsorptionsmaterial nach Waschen in neutralem Puffer bzw. isotoner NaCl-Lösung erneut verwandt werden kann.

Eine Adsorption spezifischer Antikörper konnte ausgeschlossen werden.

A new method for rapid adsorption of rheumatoid factor from serum

Summary: It is well known that autoantibodies directed against human γ -globulin, the so called rheumatoid factor (Rheumafaktor), show interference (1, 2) with immunochemical methods. Especially the enzyme-linked immunoassays for detecting the early immune reaction against virus-infections (e. g. rubella, measles, and others) show irregular positive results, if the tests are performed in samples containing IgM rheumatoid factor (3, 4).

We describe a new method for the rapid adsorption and elimination of rheumatoid factor from rheumatoid factor containing serum samples, using a suspension of glutaraldehyde-cross-linked, aggregated IgG in a combined solid- and liquid-phase technique. The bound rheumatoid factor can be subsequently desorbed at acid pH so that after washing in neutral-buffer or physiological saline the adsorption-material can be used again.

Specific antibodies were not adsorbed.

¹) † 27. Januar 1986

Einführung

Die Rolle des Rheumafaktors als Störquelle bei immunologisch-serologischen Verfahren der medizinischen Diagnostik ist seit langem bekannt. Neben Beeinflussung der Lues-Serologie (5) kennen wir die Interferenz mit Agglutinationstesten auf Australia-Antigen (6), Cryptococcosis (7), mit diversen Immunfluoreszenztechniken (8) und der passiven Hämagglutination (9) zum Nachweis einer Toxoplasmose, Mononucleose u. a.; Einflüsse auf Methoden zur Erfassung zirkulierender Immunkomplexe sind ebenfalls beschrieben (10, 11).

Insbesondere aber die radio- und enzymimmunologischen Verfahren zum Nachweis frisch stattgehabter Virusinfektionen werden durch Rheumafaktoren im Sinne einer falsch positiven Reaktion beeinflusst (2, 3, 12–15). In Hinblick auf Rheumafaktor-Interferenz besonders eindringlich untersucht ist wegen der mit ihm potentiell verbundenen eugenischen Problemstellung der *Rubella*-spezifische IgM-Nachweis (1).

Das relativ häufige Vorkommen von Rheumafaktoren auch bei Krankheiten außerhalb des rheumatischen Formenkreises bzw. auch klinisch Gesunden läßt die Gefahr potentieller Fehlbestimmungen durch Rheumafaktor-Interferenz zu einem nicht vorhersehbaren Risiko werden.

So wird die Bestimmung von spezifischen Antikörpern durch das gehäufte gleichzeitige Vorkommen von Rheumafaktoren bei akuten Infektionen mit z. B. *Rubella*-, *Influenza*-, *Parainfluenza*-, *Resp.-Syncytial*-, *Mumps*-, *Herpes simplex*-Virus u. a. kompliziert (4). Aber auch über den überdurchschnittlich häufigen Nachweis von Autoantikörpern des Rheumafaktor-Typen bei Erkrankungen wie Asthma bronchiale (15, 16), reaktiver Synovitis (17), degenerativen Gelenkerkrankungen (18), Morbus *Basedow* (19), der Hepatitis B in akuter und chronischer Verlaufsform (20, 21, 22), bei lymphoproliferativen Erkrankungen (23) sowie bei Mononucleose (24) und primär und sekundär entzündlichen Erkrankungen unterschiedlicher Genese (25) wurde in jüngster Zeit berichtet. Das Auftreten von Rheumafaktoren in der Schwangerschaft (26, 27) erhält wegen der möglichen eugenischen Fragestellung zum Beispiel im Zusammenhang mit dem Nachweis einer akuten *Rubella*-Infektion eine besondere Brisanz und unterstreicht die Wichtigkeit einer suffizienten Rheumafaktor-Adsorption in solchen Fällen.

Die bisher bekannten Rheumafaktor-Adsorptionsmethoden (1, 6, 7, 28, 29) weisen eine Reihe von Nachteilen auf, so z. B. begrenzte Bindungskapazität des Adsorptionsmittels (3, 6, 7) oder Unspezifität der

Adsorptionsphase (9,30). Auch sind Methoden, bei denen der Rheumafaktor als Immunkomplex gebunden in der Probe verbleibt (31), kritisch einzuschätzen.

Material und Methoden

Proben

1. Seren von 23 Patienten mit und ohne klinisch manifester rheumatoider Arthritis. Die höchste Aktivität an Rheumafaktoren betrug $2,7 \cdot 10^6$ IE/l, die niedrigste $0,017 \cdot 10^6$ IE/l.
2. Anti-*Rubella*-IgM-haltige Seren (N = 2), Probengewinnung 14 d nach Aufschießen des Röteln-Exanthems bzw. 14 d post vaccinationem.

Reagenzien und Test-Kits

Mittels Ionenaustauschchromatographie (Diethylaminoethyl-Cellulose) isoliertes humanes IgG wurde uns freundlicherweise von der Fa. Biotest, Pharma-GmbH, Dreieich, zur Verfügung gestellt.

Glutaraldehyd reinst, 25%ig # E 230/280 – Feinbiochemica der Fa. Serva, Heidelberg.

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung der Fa. Behringwerke AG, Marburg.

Rapi-Tex®-RF, Behringwerke AG, Marburg.

Cordia®-RF, Byk-Mallinckrodt, Dietzenbach.

Röteln-Hämagglutinationshemmtest – HHT, Rube HIT®, Behringwerke AG, Marburg.

Enzygnost®-Rubella, Behringwerke AG, Marburg.

Rubazyme®-M, Abbott-Diagnostics Div., Irving, Texas, USA.

HAVAB®-M EIA, Abbott Diagnostics Div., Irving, Texas, USA.

Geräte

Quantitative Messungen wurden mit Photometer Eppendorf 1101 M mit Rechner 6432 der Fa. Eppendorf Gerätebau, Hamburg und Photometer „Quantum“ mit integriertem Rechner, Fa. Abbott Diagnostics Div., Irving, Texas, USA, durchgeführt.

Allgemeine Analytik

Quantitative Proteinbestimmungen erfolgten über die Biuret-Reaktion (32), Reinheitsbeurteilungen (IgG-Präparationen) via Acetatgel-Elektrophorese bzw. mittels Immunelektrophorese; die dazu benutzten Geräte stammten von der Fa. Boskamp Gerätebau KG, Hersel bei Bonn.

Präparation des Rheumafaktor-Adsorbens: Glutaraldehyd-vernetztes-aggregiertes IgG

Zur Herstellung des Rheumafaktor-Adsorbens wurde das Prinzip der Vernetzung von Proteinen durch Glutaraldehyd (33) eingesetzt.

5 ml einer Lösung von 50 g/l humanem IgG in 0,15 mol/l Natriumchlorid-Lösung, mit Natrium-Phosphat auf pH 7,2 gepuffert, wurden zur Hitzeaggregation 20 min bei 60 °C im Wasserbad inkubiert. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurde zu dieser Lösung 1 ml einer 0,25 mol/l (2,5%igen) wäßrigen

gen Lösung von Glutaraldehyd unter ständigem Rühren langsam zugetropft. Das sofort bzw. nach wenigen Sekunden entstandene Gel wurde für 3 Stunden bei Raumtemperatur belassen und anschließend durch Spateldruck bereits vorzerkleinert in 100 ml 0,1 mol/l Phosphatpufferlösung nach *Sørensen* pH 7,2 aufgenommen. Es folgte dann die vollständige Homogenisierung der Gelteilchen in einem (lose passenden) Potter-Homogenisator (Nr. 190 S, Braun, Melsungen) bis zum Erreichen einer guten Suspensionsphase. Es schloß sich eine 15minütige Zentrifugation bei 10 000 g an. Wiederholung des Homogenisierens und Zentrifugierens bis das Sediment unter dem einfachen Strahl einer Pipette („Marburg-Pipette“ = 1000 µl) problemlos und gleichmäßig in Suspension überging. In der Regel war dieser Zustand bereits nach zwei- bis dreimaligem Wiederholen der Prozedur (Homogenisieren und Zentrifugieren) erreicht.

Das Sediment wurde dann in 50 ml 0,1 mol/l Glycin-HCl-Puffer pH 2,8 überführt und zweimal im gleichen Volumen Glycin-HCl-Puffer gewaschen. Sodann erfolgte dreimaliges Waschen in phosphatgepufferter isotoner NaCl-Lösung pH 7,2. Eine Aufbewahrung in phosphatgepufferter isotoner NaCl-Lösung bei 4 °C ohne Zusatz von Stabilisatoren ist nach unseren bisherigen Erfahrungen ohne Adsorptionskapazitätsverlust über mindestens 9 Monate möglich.

Adsorptionsvorgang, Regeneration des Adsorbens

Das Verhältnis von Rheumafaktor-Adsorbens (Adsorbens) zu der in den Serumproben enthaltenen Rheumafaktor-Aktivität entscheidet über die Vollständigkeit der Rheumafaktor-Adsorption; je höher der Sedimentanteil der Adsorbens-Suspension, desto höher die Adsorptionsleistung nach Mischen mit einem entsprechend gewählten Serumvolumen. Auf gute Durchmischung der Volumina (Serum und Adsorbenssuspension) muß geachtet werden. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur und mehrmaligem zwischenzeitlichen Aufschütteln der Serum-Adsorbens-Puffer-Suspension erfolgt eine Zentrifugation für 5 min bei 10 000 g. Im Sediment befindet sich das Adsorptionsmittel mit adsorbierten Rheumafaktoren. Die so behandelte Probe im Überstand steht dann zur weiteren spezifischen Analytik zur Verfügung.

Durch den Adsorptionsvorgang tritt eine Serumverdünnung ein; wobei das Gesamtsuspensionsvolumen (d. h. Suspensionspuffer + Adsorptionsmittel selbst, da Glutaraldehyd-vernetztes aggregiertes Adsorbens als ein Gel wie Puffervolumen zu rechnen ist) die Verdünnung bedingt. Bei den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Versuchen war die genannte Rheumafaktor-Restaktivität nach Adsorption immer auf die Ausgangsaktivität im Ausgangsvolumen zurückbezogen (z. B. nach Rheumafaktor-Adsorption sei die Rheumafaktor-Restaktivität $0,01 \cdot 10^6$ IE/l, Verdünnung durch Adsorptionsvorgang 1 : 4, dann beträgt die tatsächliche Restaktivität bezogen auf das Ausgangsvolumen $0,04 \cdot 10^6$ IE/l). Bei den Experimenten zur Kapazitätsbeurteilung des Rheumafaktor-Adsorbens selbst wurde die adsorbierte Rheumafaktor-Aktivität direkt auf ein Adsorbens-Sediment-Volumen bezogen (z. B. pro µl Adsorbens adsorbierte Rheumafaktor-Aktivität in IE).

Zur Desorption der gebundenen Rheumafaktoren wurde das Adsorbens-Sediment, nachdem es zuvor der Adsorption gedient hatte, zunächst zweimal in einem 15fach größeren Volumen an phosphatgepufferter isotoner NaCl-Lösung zur Entfernung von Serumresten gewaschen. Danach Zugabe eines kleineren Volumens (etwa zweifaches ursprüngliches Serumvolumen) an 0,1 mol/l Essigsäure pH 2,8 zur Desorption. Nach Zentrifugation für 5 min bei 10 000 g befindet sich die wieder desorbierte Rheumafaktor-Aktivität im Überstand, wo sie entsprechend nachgewiesen werden kann.

Die vollständige, schnelle Desorption der Rheumafaktoren zur Regeneration des Rheumafaktor-Adsorbens erfolgt durch dreimaliges Waschen des zuvor zur Adsorption benutzten Adsor-

bens-Sediments in einem größeren Volumen (ca. 15–20faches Sedimentvolumen) 0,1 mol/l Essigsäure. Nach Äquilibration der Adsorbens-Suspension gegen phosphatgepufferter isotoner NaCl-Lösung pH 7,2 (z. B. durch dreimaliges Waschen in 15fach größerem Volumen als Adsorbens-Sediment) war die Regeneration beendet. Das Adsorbens stand sodann für einen erneuten Einsatz zur Verfügung.

Ergebnisse und Interpretation der Befunde

In Abbildung 1 ist beispielhaft der Vorgang einer Rheumafaktor-Adsorption mit nachfolgender Desadsorption und Regeneration des Rheumafaktor-Adsorbens dargestellt. Wie mit der dokumentierten Versuchsdurchführung verdeutlicht, war im adsorbierten Serum gegenüber der noch unadsorbierten Probe (Endtiter 1 : 320) keine Rheumafaktor-Aktivität im

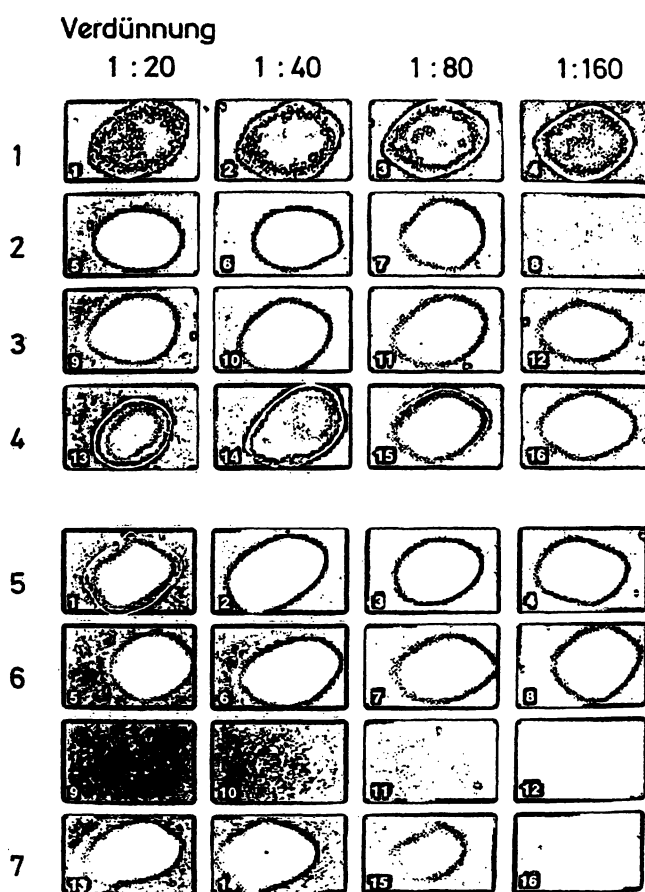


Abb. 1. Die Abbildung zeigt einen Adsorptions-Desorptionsvorgang (dokumentiert im Latex-Agglutinationstest); von oben nach unten:

- 1 = Rheumafaktor-haltiges Serum nicht adsorbiert,
- 2 = nach Adsorption,
- 3 = Waschflüssigkeit (phosphatgepufferter isotoner NaCl-Lösung) nach Adsorption (es werden durch das Waschen allein keine Rheumafaktoren abgelöst),
- 4 = Desorption mit 0,1 mol/l Essigsäure,
- 5 = 2. Desorption,
- 6 = 3. Desorption.
- 7 zeigt nochmalige Adsorption mit demselben Adsorbens wie in 2 nach Regeneration.

Latex-Agglutinationstest mehr nachweisbar. Die über den Adsorptionsvorgang erreichte Serumverdünnung (1 : 3) war bei entsprechender ausgleichender Verdünnung der unadsorbierten Kontrolle durch phosphatgepufferte isotone NaCl-Lösung ausgeglichen. Waschen in phosphatgepufferter isotoner NaCl-Lösung alleine ist nicht in der Lage, den gebundenen Rheumafaktor wieder abzulösen. Erst Ansäuerung der Probe – Zugabe von 0.1 mol/l Essigsäure zum Adsorbens-Sediment – führt zu seiner Desorption. Nach weiterem Waschen zunächst in 0.1 mol/l Essigsäure, dann in phosphatgepufferter isotoner NaCl-Lösung, steht das Adsorbens zur erneuten Adsorption zur Verfügung und hat, wie ebenfalls in Abbildung 1 dokumentiert, nichts von seiner Rheumafaktor-Bindungskapazität eingebüßt.

Tab. 1. Vergleich von Absorbanz und Rheumafaktor vor und nach Rheumafaktor-Adsorption mittels Rheumafaktor-ELISA (Cordia®-RF).

Patient	Unadsorbiert		Adsorbiert	
	A _{405 nm}	Rheumafaktor (10 ⁶ IE/l)	A _{405 nm}	Rheumafaktor (10 ⁶ IE/l)
GAU	2,4000	> 0,5	0,166	0,015
TSCH	1,327	> 0,5	0,125	< 0,01
WEY	1,228	> 0,5	0,110	< 0,01
ARN	1,119	> 0,5	0,107	> 0,01
RÜF	1,068	> 0,5	0,090	> 0,01
WER	0,269	0,04	0,028	0
KRI*	0,069	0	0,047	0
neg. Kontr.	0,070	0		

* Seronegative rheumatoide Arthritis.

Die Effektivität der Rheumafaktor-Adsorption mit der beschriebenen Technik wird an einigen Beispielen aufgezeigt (Tab. 1). Bei einem Mischverhältnis Adsorbensvolumen (Adsorbens-Sediment) mit Serumvolumen wie 1 + 2 ließen sich nach einmaliger Adsorption aus den Serumproben bereits total bis subtotal die Rheumafaktoren entfernen, wie anhand der mittels eines Rheumafaktor-ELISA ermittelten Rheumafaktor-Aktivitäten (IE/l) vor und nach Rheumafaktor-Adsorption anhand einiger Serumproben beispielhaft dokumentiert wurde (Tab. 1). Vergleichbare Ergebnisse erhält man auch bei Einsatz der Latex-Agglutination (hier nicht gesondert gezeigt).

Zur Untersuchung der Kapazität des Rheumafaktor-Adsorbens in Abhängigkeit von der jeweiligen individuell vorgegebenen Rheumafaktor-Ausgangsaktivität wurden die Rheumafaktor-Aktivitäten von 12 Seren vor und nach Adsorption in einem ELISA auf Rheumafaktor (Cordia®-RF, Byk-Mallinckrodt) bestimmt. Zum Ausgleich der durch Zugabe des Adsorbens erwirkten Serumverdünnung (Verdünnungsfaktor hier = 2) wurden die nach Adsorption ermittelten Rheumafaktor-Werte (IE/l) rechnerisch verdoppelt. Wie in Tabelle 2 ersichtlich, erreichten wir bei dieser Versuchsanordnung Adsorptionsleistungen von mindestens 60,4% und maximal 95,3%, gemessen an den jeweiligen Rheumafaktor-Ausgangsaktivitäten. Die mittlere Adsorptionskapazität kann bei den vorgegebenen Versuchsbedingungen mit 76,8% angegeben werden. Auffällig war, daß keine Korrelation zwischen Höhe der Rheumafaktor-Ausgangsaktivität und Vollständigkeit der Rheumafaktor-Elimination durch die Adsorption besteht. So wurden hohe Rheumafaktor-Aktivitäten teilweise vollständiger adsorbiert als niedrigere.

Tab. 2. Auswertung einer Rheumafaktor-Adsorption an 12 versch. Rheumafaktor-haltigen Seren. Angabe der Adsorptionskapazität in Prozent der Gesamtaktivität des unverdünnten Serums. Verdünnung durch Adsorptionsvorgang wurde durch entsprechende Multiplikation der Rheumafaktor-Restaktivität (nach Adsorption) rechnerisch ausgeglichen.

Patient	Rheumafaktor Latex-Titer vor Adsorption	Rheumafaktoraktivität		adsorbiert (10 ⁶ IE/l)	Anteil
		vor Adsorption (10 ⁶ IE/l)	nach Adsorption (10 ⁶ IE/l)		
WER	1 : 20	0,017	0,005	0,012	0,706
REI	1 : 40	0,072	0,019	0,053	0,742
ARN	1 : 160	0,260	0,080	0,180	0,692
WEJ	1 : 320	0,280	0,066	0,214	0,764
BICK	1 : 160	0,300	0,018	0,282	0,953
SCHNEI	1 : 160	0,360	0,110	0,250	0,694
BLU	1 : 320	0,410	0,068	0,342	0,834
TSCHO	1 : 320	0,440	0,078	0,362	0,823
HER	1 : 160	0,560	0,208	0,352	0,629
BOH	1 : 160	0,560	0,222	0,338	0,604
GAU	1 : 640	1,040	0,170	0,870	0,837
LAN	1 : 1200	2,700	0,160	2,540	0,941

Da wir bei der Präparation unseres Rheumafaktor-Adsorbens von der Vorstellung ausgingen, daß eine relative Dichte des Gammaglobulin-Substrates, wie wir sie mit Glutaraldehydvernetzung erreichen, eine wichtige Voraussetzung für eine gute Adsorptionskapazität sein müßte, war im folgenden zu klären, ob eine Beziehung auch zwischen der Adsorbens-Suspensionsdichte und der Adsorptionskapazität besteht. Die Klärung dieses Problems war überdies auch im Hinblick auf eine gute (Routine-) handhabbarkeit von nicht unwesentlicher Bedeutung, da dünne Suspensionen (z. B. mit einer Tropfpipette) einfacher Proben zuzusetzen wären.

Die Adsorbens-Suspensionen bzw. die Serumverdünnungen wurden wie folgt erstellt:

	Adsorbens (μ l)	Phosphatgepufferte isotone NaCl-Lösung (μ l)
Suspension a	80	40
Suspension b	80	80
Suspension c	80	320
Suspension d	80	640

Jeweils 100 μ l der Suspensionen a–d wurden mit je 100 μ l Rheumafaktor-Serum vermischt; d. h. alle Serien waren durch die Adsorptionsprozedur 1 : 2 verdünnt, die Verdünnung des Adsorptionsmittels folgte der Reihe 1 : 1,5; 1 : 2; 1 : 5 und 1 : 9 = Volumen Adsorbens-Sediment zu Gesamtvolumen (aus Serum, Adsorbens-Sediment und phosphatgepufferter isotoner NaCl-Lösung). Bezieht man dann die adsorbierte Rheumafaktor-Aktivität auf die in der Probe tatsächlich vorhandene Menge an Adsorptionsmittel, so erhält man eine deutliche Steigerung der Rheumafaktor-Adsorptionskapazität mit zunehmender Verdünnung der Adsorbens-Suspension. Tabelle 3 gibt die Zusammenstellung. Drückt man die gemessenen Kapazitätssteigerungen ab Adsorbens-Ausgangsverdünnung a (1 : 1,5) als Zunahme-Faktor aus – Tabelle 4 – so erhält man im Vergleich aller vier Proben (BICK, TSCHO, HER, LAN) ähnliche Steigerungsraten, ausgedrückt durch die relative Konstanz der ermittelten Faktoren.

Tab. 3. Durch 1 μ l Adsorbens adsorbierte Rheumafaktoren (IE) pro 100 μ l Serum bei Adsorbens-Konzentrationen a–d (vgl. Beschreibung des Versuchsaufbaus).

Patient	a	b	c	d
BICK	4,3	5,7	13,6	21,1
TSCHO	5,7	7,2	16,3	21,6
HER	5,5	7,9	15,5	22,5
LAN	39,4	52,3	106,0	156,6

Abbildung 2 zeigt das von der Suspensionsdichte abhängige Rheumafaktor-Adsorptionsverhalten unseres Adsorbens in graphischer Form. Dabei demonstriert die untere Kurve (—) die Auftragung der Adsorptionssteigerung bezogen auf die willkürlich gewählte Adsorbens-Stammverdünnung a (Verd. 1,5), die obere Kurve (---) zeigt einen auf die unverdünnte Suspension (reines Sediment) zurückgerechneten (theoretischen) Verlauf als Ausdruck der allgemeingültigen Rheumafaktor-Bindungskinetik unseres

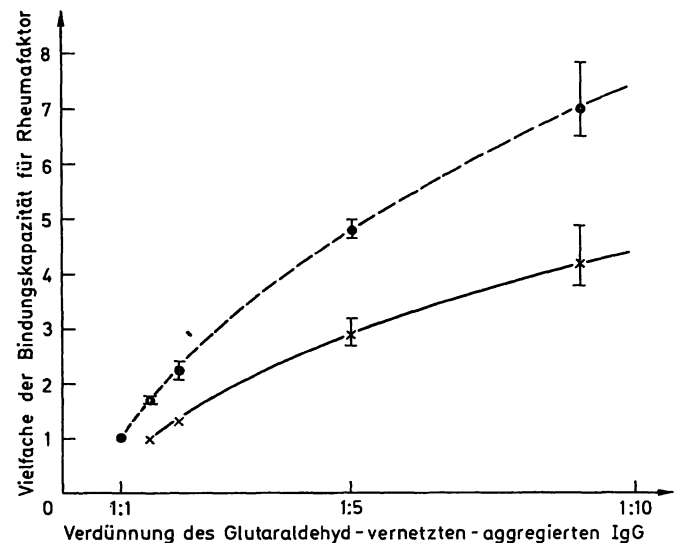


Abb. 2. Abhängigkeit der Rheumafaktor-Adsorptionskapazität von der Suspensionsdichte des Adsorbens – Erläuterungen s. Text. n = 4; angegeben ist nicht die Standardabweichung, sondern der Bereich zwischen den gemessenen Extremwerten.

Patient	A _{405 nm}	Rheumafaktor [10 ⁶ IE/l]	
LAN	0,511	2,70	Korrelationskoeffizient r = 0,91 t = 4,4 0,01 < p < 0,02
GAU	0,341	1,04	
BLU	0,244	0,41	
HER	0,218	0,56	
BICK	0,212	0,30	
BOH	0,121	0,56	

Tab. 4. Zunahme der Rheumafaktor-Adsorptionskapazität von Glutaraldehyd-vernetztem-aggregiertem Immunglobulin ausgedrückt als Faktor bezogen auf die Ausgangsverdünnung a.

Patient	a	b	c	d
BICK	1 = 4,3 IE	1,3	3,2	4,9
TSCHO	1 = 5,7 IE	1,3	2,9	3,8
HER	1 = 5,5 IE	1,4	2,8	4,1
LAN	1 = 39,4 IE	1,3	2,7	4,0
		x = 1,325	x = 2,90	x = 4,20

Adsorbens. Für die weitere Beschreibung der Adsorptionseigenschaften war es wichtig zu klären, ob und inwieweit Lagerungsdauer und/oder Modifikation der Präparation einen Einfluß auf die Adsorptionsleistung des Adsorbens haben.

Es wurden 7 verschiedene Präparationen (Ads. 1–7; Tab. 5) an 4 Rheumafaktor-haltigen Seren getestet. Tabelle 5 gibt den Versuchsaufbau und die nach Adsorption gemessenen Rheumafaktor-Restaktivitäten (IE/l) wieder. „Nativ-acid“ bedeutet in diesem Zusammenhang, daß das zur Adsorptionspräparation verwandte IgG nicht hitzeaggregiert und damit also nativ mit Glutaraldehyd vernetzt wurde, gleichwohl aber der üblichen Behandlung mit Glycin-HCl-Puffer („acid“) unterworfen war. „Neutral“ bedeutet: keine Nachbehandlung mit Glycin-HCl. Im Ansatz „Ads. 3“ wurde erst im Anschluß an die bereits abgeschlossene Präparation des Adsorbens bzw. nach Suspension hitzeaggregiert. Alle anderen Chargen unterscheiden sich lediglich durch ihre Herstellungsdaten und damit in der Lagerungsdauer; Zeitpunkt des dokumentierten Versuchs: 01. 07. 1983.

Bei Betrachtung der in Tabelle 5 zusammengefaßten Ergebnisse zeigte die Adsorbenspräparation, bei der die Hitzeaggregation nach abgeschlossener Suspension des Glutaraldehyd-vernetzten Immunglobulins erfolgte, die mit Abstand schlechtesten Adsorp-

tionsleistungen; offensichtlich verändert Hitzebehandlung nach erfolgter IgG-Vernetzung mittels Glutaraldehyd die Antigenität zuungunsten der Affinität des Rheumafaktor ihm gegenüber. Umgekehrt schafft alleinige Vernetzung von IgG durch Glutaraldehyd ohne vorherige Hitzeaggregation (Ads. 1) ausreichend dicht beieinanderliegende antigene Determinanten zur stabilen Bindung des Rheumafaktors. Die Lagerungszeit hatte bisher keinen Einfluß auf die Adsorptionsleistung.

Die Inkubationszeit der Adsorptionsreaktion hat auf Bindung der Rheumafaktoren einen nachweisbaren Einfluß. Eine Inkubationsdauer von 30 Minuten erwies sich unter den Verfahrensbedingungen im Mittel am wirkungsvollsten, gemessen an in den Proben jeweils verbleibenden Rheumafaktor-Restmengen (vgl. Tab. 6). Längere Inkubationszeiten brachten keinen zusätzlichen Effekt. Eine Inkubation von lediglich 10 Minuten wies eine deutlich schlechtere Adsorptionsleistung auf. Absolut unbefriedigende Ergebnisse zeigte eine 14 h lange Inkubation bei 4 °C (Kühlschrank). Eine Zunahme der Rheumafaktor-Aktivität durch einfaches Belassen der nativen Seren für 6 h bei Raumtemperatur war, wenn auch in relativ geringem Maße, bei zwei der drei Proben feststellbar – Dissoziationsphänomene (34) spielen dabei eventuell eine Rolle.

Tab. 5. Dargestellt ist die Adsorptionskapazität diverser Chargen und Präparationsmodifikationen von Glutaraldehyd-vernetztem-aggregiertem-IgM: Ads. 1–7 über die Angabe der jeweiligen Rheumafaktor-Restaktivität nach Adsorption. Der dokumentierte Versuch wurde am 1. 7. 83 durchgeführt. Das reine Adsorbens-Sediment war im Volumenverhältnis 1 : 2 in phosphatgepufferter isotoner NaCl-Lösung suspendiert. 100 ml dieser Suspension wurden 100 µl Serum zugefügt. Daraus resultierte eine Serumverdünnung von 1 : 2 und eine Verdünnung des Adsorbens wie 1 : 4.

	vor Ads.	Ads. 1	Ads. 2	Ads. 3	Ads. 4	Ads. 5	Ads. 6	Ads. 7
LAN	2,700	0,146	0,156	1,400	0,380	0,130	0,104	0,150
TSCHO	0,500	0,096	0,102	0,220	0,100	0,074	0,062	0,078
BICK	0,270	0,018	0,144	0,120	0,022	0,010	0,012	0,013
HER	0,630	0,140	0,126	0,350	0,160	0,120	0,144	0,190
Ads. 1 Adsorbens	— nativ-acid		(vom 10. 2. 83)					
Ads. 2 Adsorbens	— neutral		(vom 23. 1. 83)					
Ads. 3 Adsorbens	— nach Vernetzung hitzeaggregiert		bei 60 °C 20 min (vom 9. 6. 83)					
Ads. 4 Adsorbens			(vom 29. 12. 82)					
Ads. 5 Adsorbens			(vom Okt. 82)					
Ads. 6 Adsorbens			(vom 14. 6. 83)					
Ads. 7 Adsorbens			(vom 10. 6. 83)					

Tab. 6. Einfluß der Inkubationszeit auf die Adsorptionskapazität von Glutaraldehyd-vernetztem-aggregiertem-IgM bei Raumtemperatur. Angegeben sind Rheumafaktor-Restaktivitäten in 10⁹ IE/l. Adsorbens: Serum wie 1:4 (Ads.-Vol.: Ges.-Vol. = 1:4).

Patient	Vor Adsorption				Nach Adsorption		
	0 min	6 h	10 min	30 min	2 h	6 h	14 h
ARN	0,300	0,320	0,114	0,094	0,082	0,068	0,084
BOH	0,530	0,530	0,220	0,186	0,180	0,164	0,380
LAN	2,700	3,100	0,140	0,110	0,130	0,152	0,520

Hinweise für die praktische Nutzung

Auf die Beeinflussung immunologischer Bestimmungsverfahren durch entsprechende Rheumafaktor-Aktivität wurde eingangs bereits hingewiesen. Die Gefährlichkeit der Konstellation: Spezifisches IgG bei gleichzeitigem Vorhandensein von IgM-Rheumafaktor hinsichtlich falsch positiver spezifischer IgM-Titer stellt wegen eventueller eugenischer Konsequenzen bei den ELISA zum Nachweis einer frischen Röteln-Infektion einen besonderen Problemfall dar. Beachtenswert ist dabei, daß selbst geringe Konzentrationen an Rheumafaktor zur Vortäuschung einer deutlich spezifischen IgM-Antwort ausreichen (Tab. 7). Nach einmaliger, subtotaler Adsorption der Rheumafaktoren sind zunächst falsch angezeigte hohe Anti-Rubella-IgM-Titer nicht mehr in dieser Höhe nachweisbar. Wie in Tabelle 7 dokumentiert, folgt der Abnahme des Rheumafaktor-Titers konsequent die entsprechende Reduktion des falsch positiven „spezifischen“ IgM-Titers.

Auch in ihrer Aussage einfache Tests ohne quantitative Titerangaben wie der Rubazym®-M-Test zeigen eine Rheumafaktor-Interferenz (Abb. 3). Im „Graubereich“ dieser Methode sind die erhaltenen Angaben (Absorbanzen) deutlich abhängig von der in der Probe enthaltenen Rheumafaktor-Aktivitäten. Die Adsorptionskapazität unseres Adsorbens war in den von uns untersuchten Proben auch bei Einsatz nicht vorverdünnter Seren immer ausreichend hoch, um die durch Rheumafaktoren vorgetäuschten spezifischen IgM-Titer zu eliminieren. Gleichwohl wäre es theoretisch denkbar, daß bei extrem hohen Rheumafaktor-Konzentrationen (Rheumafaktor-Titer > 1 : 2000) eine zweite Adsorption bzw. eine Vorverdünnung der Proben erforderlich wäre. Da jedoch bei den meisten ELISA-Verfahren zum Nachweis spezifischer IgM-

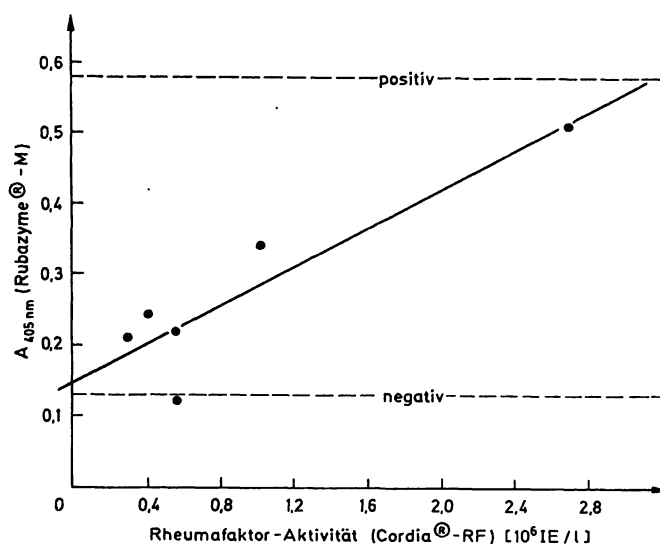


Abb. 3. Abhängigkeit der Indikatorreaktion (Rubazyme®-M) von der Rheumafaktor-Aktivität (IE), gemessen mit einem Rheumafaktor-ELISA (Cordia®-Rheumafaktor).

Antikörper Probenvorverdünnung in der Regel vorgeschrieben sind, böte sich für die Praxis die Einschaltung der Rheumafaktor-Adsorption im Rahmen der Probenverdünnung an, zumal die Adsorptionsleistung unseres Adsorbens in dünnen, d. h. geringer konzentrierten Adsorbenssuspensionen deutlich gesteigert ist (vgl. Abb. 2).

Durch die Rheumafaktor-Adsorption durch unser Adsorbens kommt es nicht zum Verlust spezifischer Antikörper. Entsprechend konnten im Hämagglutinationshemmtest Rube HIT® vor und nach Rheumafaktor-Adsorption keine Titerunterschiede gefunden werden (Tab. 8).

Tab. 7. Vortäuschung spezifischer IgM-Antikörper gegen *Rubella*-Antigen durch Rheumafaktoren im Enzym-Immunoassay (ELISA — Enzygnost® — *Rubella*). Gegenübergestellt sind die vor und nach Teiladsorption der Rheumafaktoren ermittelten IgM-Titer gegen *Rubella* und die korrespondierenden Rheumafaktor-Titer, ermittelt mit der Rheumafaktor-Latex-Agglutination (Rapi Tex®-Rheumafaktor).

Patient	Diagnose	Vor Rheumafaktor-Adsorption		Nach Rheumafaktor-Adsorption	
		Titer: Rheuma- faktor	Titer: Anti- <i>Rubella</i> -IgM	Titer: Anti- <i>Rubella</i> -IgM	Titer: Rheuma- faktor
GAU	Pneumonie	1 : 600	1 : 640	1 : 80	1 : 30
TSCH	Rheumatoide Arthritis	1 : 320	1 : 320	1 : 40	1 : 30
BOH	Rheumatoide Arthritis	1 : 160	1 : 160	1 : 80	1 : 20
ARN	Rheumatoide Arthritis	1 : 80	1 : 80	1 : 40	1 : 10
RUF	Rheumatoide Arthritis	1 : 60	1 : 160	1 : 80	1 : 5
REI	Hepatitis B	1 : 40	1 : 160	1 : 40	0
WER	Lebercirrhose	1 : 20	1 : 160	1 : 80	0

Tab. 8. Bestimmung des Immunitätsstatus gegen *Rubella* im Hämagglutinationshemmtest (Rube HIT®, Fa. Behringwerke AG) vor und nach Adsorption der Rheumafaktoren.

Patient	Titer: <i>Rubella</i> HIT®	
	vor Adsorption	nach Adsorption
GAU	1 : 128	1 : 128
TSCHO	1 : 32	1 : 32
BOH	1 : 128	1 : 128
ARN	1 : 164	1 : 164
RÜF	1 : 16	1 : 16
REI	1 : 32	1 : 32
WER	1 : 256	1 : 256

Spezifische IgM-Antikörper werden nicht adsorbiert. Ein entsprechender Beleg wurde durch die Bearbeitung zweier Anti-*Rubella*-IgM-haltiger Seren erbracht. Serum „SCHAM“ stammt von einem akut an Röteln erkranktem Schulkind, Serum „LIN“ von einer geimpften jungen Frau, beide waren seronegativ (kein Rheumafaktor). Die Probennahme erfolgte jeweils 14 h nach Aufschießen des Exanthems bzw.

post vaccinationem. Wie in Tabelle 9 dokumentiert, hat das Adsorptionsverfahren dabei keinen Einfluß auf die spezifischen *Rubella*-IgM-Titer. Die im Testansatz mitgeführten Rheumafaktor-haltigen Seren „BICK“ und „LAN“ dagegen zeigten, wie zu erwarten, einen deutlichen Titerabfall bzw. eine Elimination der falsch positiven IgM-Titer.

Tab. 9. Kein Einfluß der Rheumafaktor-Adsorption (Adsorbens + Serum = 1 + 1) auf die anti-*Rubella* IgM-Titer bei SCHAM und LIN; die Rheumafaktor-Seren LAN und BICK zeigen einen deutlichen Titerabfall nach Rheumafaktor-Adsorption. Kleinste Titerstufe 1:40 (d. h. <1:40 = 0), Enzygnost®-*Rubella*.

Patient	Titer: Anti- <i>Rubella</i> -IgM	
	vor Rheumafaktor-Adsorption	nach Rheumafaktor-Adsorption
SCHAM	1:1280	1:1280
LIN	1 : 160	1 : 160
LAN	1 : 160	<1 : 40
BICK	1 : 160	<1 : 40

Literatur

- Meurmann, O. H. & Ziola, B. R. (1978) *J. Clin. Pathol.* 31, 483.
- Büttler, R. & Brunner, E. (1974) *Vox Sang.* 25, 466–469.
- Ziegelmaier, R. & Bieker, R. (1982) *Laboratoriumsblätter* 32, 35–38.
- Salonen, E. M., Vaheri, A., Suni, J. & Wager, O. (1981) *J. Infect. Dis.* 142, 250–255.
- Geisen, H. P. & Seelig, H. P. (1979) *Lab. Med.* 3, 23–26.
- Zalan, E., Wilson, C. & Labzoffsky, N. A. (1973) *Arch. Ges. Virusforsch.* 40, 1971–173.
- Gordon, M. A. & Lapa, E. W. (1974) *Am. J. Clin. Pathol.* 61, 488–494.
- Yeni, P., Segond, P., Massias, P. & Pillot, J. (1978) *Lancet* I, 219–220.
- Roberts, R., Chabasse, D. & Hoque, T. P. (1980) *Biomed. Express* 35, 61–65.
- Wager, O. & Lindström, P. (1982) *Scand. J. Immunol.* 1, 319–328.
- Wager, O., Lindström, P., Räsänen, J. A., Kekomäki, R., Ziola, B., Salmi, A., Isomäki, H., Skrifvars, B. & Penttinen, K. (1982) *J. Clin. Exp. Med.* 46, 149–160.
- Sever, J. L. (1962) *J. Immunol.* 88, 320 zitiert n. Bouin, O. (1973) *Quantitativ-virologische Methodik*, Stuttgart p. 228.
- Yolken, R. H. & Leister, F. J. (1981) *J. Clin. Microbiol.* 14, 427–432.
- Leinikki, P. O., Shekarchi, I., Dorsett, P. & Sever, J. L. (1978) *J. Lab. Clin. Med.* 92, 849–857.
- Edgeskjold, E. M., Graudal, H., Sorensen, H. J. & Permin, H. (1977) *Lancet* II, 456–457.
- Zuraw, B. L., O'Hair, C. H., Vaughan, J. H., Mathison, D. A., Curd, J. G. & Katz, D. H. (1982) *J. Clin. Invest.* 68, 1610–1613.
- Hrncir, Z., Vavrina, J., Salavec, M. & Tichy, M. (1976) *Rev. Czech. Med.* 21, 166–170.
- Verdier, J. M., Cassuto, J. P., Viot, G., Quaranta, J. F. & Krebs, B. P. (1981) *Nouv. Presse Med.* 9, 1073–1075.
- Silverberg, J., Row, V. V. & Volpier, R. (1978) *Am. Intern. Med.* 88, 216–217.
- Markenson, J. A., Daniels, C. A., Notkins, A. L., Hofnagle, J. H., Gerety, J. & Barker, L. F. (1976) *Clin. Exp. Immunol.* 19, 209–217.
- State, I., Runcan, V., Voiculescu, M. & State, D. (1973) *Rev. Roum. Med. Intern.* 10, 29–36.
- Kacaki, J. N., Siem, T. H. & Brouwer, R. (1977) *Lancet* I, 1008–1009.
- Roberts-Thomson, P. J. & Bradley, J. (1980) *Clin. Exp. Immunol.* 37, 408–415.
- Capra, J. D., Winchester, R. J. & Kunkel, H. G. (1969) *Arthr. Rheum.* 12, 67–73.
- Cohen, J., Joyce, L., Blanchard, F., Etienne, J. C., Gougeon, J. & Dropsy, G. E. (1982) *Ann. Immunol.* 132, 201–210.
- Meurmann, O. H., Terho, P. & Salmi, A. (1979) *Lancet* II, 685–686.
- Vejtorp, M. (1979) *Lancet* I, 215–216.
- Vejtorp, M. (1981) *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 89, 123–128.
- Naot, Y., Barnett, E. V. & Remington, J. S. (1981) *J. Clin. Microbiol.* 14, 73–78.
- Skaug, K. & Gaarder, P. J. (1978) *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. C. Immunol.* 86, 33–36.
- Ziegelmaier, R., Bieker, R., Behrens, W. & Vermeer, H. (1983) *Laboratoriumsblätter* 33, 19–25.
- Weichselbaum, T. E. (1946) *Am. J. Clin. Pathol.* 10, 40. Zitiert n. W. Rick (1977) *Klinische Chemie und Mikroskopie* Berlin–Heidelberg–New York.
- Avrameas, S. & Ternyck, T. (1969) *Immunochem.* 6, 53–66.
- Allen, J. & Kunkel, H. G. (1966) *Arthr. Rheum.* 9, 758–768.

Dr. Dr. Gerald Kolb
Klinikum der
Philipps-Universität Marburg
Zentrum für Innere Medizin
Med. Klinik und Poliklinik
Lahnberge
D-3550 Marburg